

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公表  
 ⑪ 公表特許公報 (A) 平1-502158

⑤ Int.Cl.  
 C 12 P 21/02 識別記号 広内整理番号  
 B-6712-4B 寄査請求 未請求  
 予備寄査請求 未請求 部門(区分) 1 (1)  
 (全 16 頁)

⑫ 公表 平成 1 年(1989)8 月 3 日

⑬ 発明の名称 ジペプチドの酸素的製造方法

⑭ 特願 昭63-501981  
 ⑮ ⑯ 出願 昭63(1988)2月15日

⑭ 翻訳文提出日 昭63(1988)10月12日

⑮ 國際出願 PCT/DK88/00022

⑯ 國際公開番号 WO88/06187

⑰ 國際公開日 昭63(1988)8月25日

優先権主張 ⑬ 1987年2月13日 ⑭ デンマーク(DK) ⑮ 0725/87  
 ⑭ 発明者 ソルベツク, ピア デンマーク国 デイーケイー-2970 ホールショルム, スドル. ヤグ  
 トベユ 39  
 ⑭ 発明者 ウィツドマー, フレッド デンマーク国 デイーケイー-2980 コケツダル, ブロンショルムダ  
 ルズベユ 53  
 ⑭ 出願人 カールスバーグ バイオテクノ デンマーク国 デイーケイー-2200 コベンハーゲン エヌ, タゲン  
 ロジー リミテッド アクチ- スペユ 16  
 ⑭ 代理人 弁理士 浅村 晃 外3名  
 ⑭ 指定国 AU, DK, FI, HU, JP, US  
 最終頁に続く

新書(内容に変更なし)

請求の範囲

(1) 一般式



(式中、Aは側鎖が保護されていてもよいL-もしくはD-α-アミノ酸またはD-β-アミノ酸であり、Bは側鎖が保護されていてもよいAと同様もしくは異種のL-もしくはD-α-アミノカルボン酸、L-もしくはD-アミノホスホン酸またはL-もしくはD-アミノスルホン酸、または相当するD-アミノ酸、またはその塩および水和物であり、YはOHまたはC末端保護基である)を有するジペプチドを製造する方法において、式



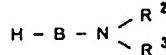
(式中、Aは先に定義したとおりであり、R<sup>1</sup>は水素、アルキル、アリールもしくはアラールキルであつて不活性置換基によつて置換されていてもよく、またアミノ酸のα-デス-アミノフラグメントであり、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は同様または異種であつて、それぞれ水素、アルキル、アリールまたはアラールキルであつて不活性置換基で置換されていてもよい)を有するアミノ酸誘導体である基質成分を、A-Bの場合は in situで形成されてもよい。

④ 式



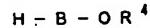
を有するL-アミノ酸、

④ 式



(式中、BはL-アミノ酸であり、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は上述の意味を有するが、R<sup>2</sup>が水素の場合にはR<sup>3</sup>はヒドロキシまたはアミノであつてもよい)を有するL-アミノ酸アミド、

④ 式



(式中、BはL-アミノ酸であり、R<sup>4</sup>はアルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するL-アミノ酸エステル、および

④ 式

$NH_2 \cdot C_x H_z PO_3 H$ または $NH_2 \cdot C_x H_z SO_3 H$  (式中、Xは1~6であり、Zは2~12である)を有し、側鎖が保護されていてもよい直鎖状または分枝状アミノホスホン酸またはアミノのスルホン酸から選ばれる求核成分とを、酵母、動物、植物または他の微生物からのセリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼの存在下、pH 5~10.5、所望により有機溶媒および/または塩を含有する水性溶媒または懸濁液中で反応させ、ついで所望により、存在する側鎖保護基もしくは保護基Yの切断および/または、所望により、得られたジペプチド誘導体の塩または水和物への変換を

特表平1-502158(2)

行うことを特徴とする製造方法。

(2) カルボキシペプチダーゼとして、酵母からのカルボキシペプチダーゼYを使用する請求の範囲第1項による製造方法。

(3) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、混合樹脂骨格と複数個のカツプリングされたベンケルスクリニル基からなるアフィニティ樹脂上アフィニティクロマトグラフイーによって精製されている請求の範囲第2項による製造方法。

(4) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、*Penicillium Janthinellum*からのベニシロカルボキシペプチダーゼS-1もしくはS-2、*Aspergillus saitoi*もしくは*Aspergillus oryzae*からのカルボキシペプチダーゼ、オレンジの葉もしくは皮からのカルボキシペプチダーゼC、*Citrus natsudaidai* HayataからのカルボキシペプチダーゼC<sub>X</sub>、豆の葉からのファセオリン、または発芽大麦、モルト、ワタの胚芽、トマト、スイカもしくはアロメリン(バイナツブル)末からのカルボキシペプチダーゼである請求の範囲第1項による製造方法。

(5) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、天然型の化学修飾された酵素または生合成異体である請求の範囲第1項から第4項までによる製造方法。

(6) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、固定化されている前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(7) 有機溶媒0~70%を含有する水性反応用液または

たは反応分散液を使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(8) 有機溶媒はアルコール類、クメチルスルホキシド、クメチルホルムアミド、ジメトキシエタン、エチレングリコールまたは酢酸エチルから選ばれる請求の範囲第7項による製造方法。

(9) 基質成分として、不活性担持器で置換されていてもよいベンケルエステルまたは直鎖状もしくは分岐状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルエステルから選ばれるD-またはL-アミノ酸エステルを使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(10) 求核成分として、式

H-B-OH または H-B-NHR<sup>3</sup>  
(式中、R<sup>3</sup>は水素またはC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>アルキルであり、BはL-アミノ酸残基である)を有するアミノ酸またはアミノ酸アミドアミドを使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(11) 求核成分として、式

H-B-OR<sup>4</sup>

(式中、Bはアミノカルボン酸残基であり、R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>アルキルである)を有するエステルを使用する請求の範囲第1項による製造方法。

(12) 得られたジペプチドが1個または2個以上のC末端保護基Yを含むし、この1個または2個以上の基を酵素的に、好ましくはエステラーゼもしくはリバーゼまたはタンパク分解酵素によって切断する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

キシペプチダーゼ酵素により切断する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(13) 得られたジペプチドが1個または2個以上の側鎖保護基を含むし、この1個または2個以上の基を酵素的に、好ましくはエステラーゼもしくはリバーゼまたはタンパク分解酵素によって切断する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

添付(内容に変更なし)

明細書

ジペプチドの酵素的製造方法

本発明は、ジペプチドおよびジペプチド試験体ならびに請求の範囲第1項の導入部分に述べた種類の化合物の酵素的製造方法に関する。

最近、D-コンフィギュレーションのアミノ酸残基を含有していてもよいジペプチドおよびジペプチド試験体に対する興味が、その薬理学的效果、たとえば抗生物質としての可能性から、高まりつつある。また、ヒトおよび家畜の人工栄養、甘味料、さらには除草剤のような農薬の分野においても、ジペプチドに大きな興味がもたらしてきた。

このようなジペプチドH-A-B-Yは、公知の化学的カツプリング反応によって製造できるが、これらの方はすべて、一般に固形アミノ酸、AおよびBのそれぞれアミノ酸およびカルボン酸基を、またさらに側鎖が官能基を有するならば多くの場合、側鎖も保護する必要があるという特徴をもつている。しかも、使用する試薬および条件のため、化学的カツプリング工程の間に副反応が起こるという固有の危険がある。主な副反応はとくにA成分のラセミ化である。化学的カツプリング工程を、緩和な条件下で進行する酵素的カツプリング工程で置き換えることにより、このような副反応およびラセミ化が回避でき、立体化学的に純粋な生成物が得られる。

特表平1-502158(3)

アミノおよびカルボキシル保護基の存在は、化学的カツアリングでもエンドプロテアーゼを用いた酵素的カツアリングでも同様に必須であり、また従来の知識でジペプチドの酵素的エキソプロテアーゼ触媒による形成でも品質のアミノ官能基には必要とされている。これは、上述の方法の工業的規模における経済性に著しく影響するいくつかの显著くない特徴を付加し、とくにジペプチドの合成の場合とくに顕著である。

不利益はこれらの基の導入と除去に因る、また操作工程でのこれらの基の存在は全過程の耗費および所要時間を増大させ、収率率に影響する。

共通して用いられるアミノ保護基の代表例としては、カルボベンゾキシ(乙-)および三級アトキシカルボニル(Boc-)型の基があり、これらの分子量はアミノ酸残基のそれにはほぼ匹敵する。まず、保護基は、別個の反応工程において、過剰な適当な試薬により発現段階に導入し、ついで分離工程に付さねばならない。現在のところ、これらの疏水性の基はその中国体および反応生成物の溶解度に著しい影響を与える場合が多く、その処理に必要な溶媒の性質および他の両者、ならびに精製および脱保護の難易に影響する。脱保護にも別個の工程を行うことになり、ついで精製工程が必要になる。

この目的には、一連の反応を利用できるが、それ自体工場的には問題のある接触水素添加を除いて、これらの方法は致しい、多くの場合、強酸性または強堿性条件

下に行われ、一連の副反応が起こることが多く、不純な生成物を生じ、面倒な精製が必要になる。

この比較的長い一連の合成工程の最終工程はかなり包括的な脱保護となり、所望のペプチドが得られるが、ほとんどの回収できない二次反応により、所望の高純度の生成物を得るにはかなり面倒な精製操作を必要とすることが多い。

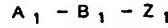
ジペプチドの製造におけるアミノ末端保護を回避する試みは、EP-A 1-074095号およびEP-A 2-102529号に記載されたアスパルテームの生成の場合の発酵工程のように微生物発酵の方向で検討されてきた。この方法は基本的に合成的アプローチとは異なり、それぞれのペプチドごとに特異的な生物に依存するもので、一般的に通用できるものではない。しかも、收率は低いことが多く、発酵培地からの回収も堅苦である。

したがつて、アミノおよびカルボキシ末端上の保護基を回避できることが、全過程の経済性という点で有利なことは自明である。本発明の目的は、これを、セリンおよびチオールカルボキシペプチダーゼ触媒によつて仲介されるジペプチド合成において可能にすることにある。ある場合には、側鎖保護基は有しても末端保護はないジペプチドを製造できることは興味深く、本発明の方法によれば、側鎖は保護されているが、アミノないしカルボキシは保護されていない出発原料に出発することが以下に示すように可能になる。この場合、同時に、簡便な反

応条件と全過程の経済性という利点が達成される。所望により、側鎖保護基は化学的または酵素的手段で切断できる。

側鎖非保護アミノ酸誘導体と、C末端は保護されなくてよいD成分(求核性)の使用を可能にする酵素触媒カツアリング反応は知られている〔たとえばDK特許(出願第5202/80号および相当するEP特許出願第17485号(EP-B1-17485号)参照〕。

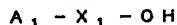
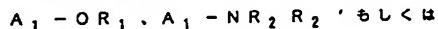
EP-B1-17485号には、一般式



(式中、 $A_1$ はN末端保護アミノ酸残基、またはC末端L-アミノ酸残基を有しN末端が保護されていてもペプチド残基であり、 $B_1$ はL-アミノ酸残基であり、 $Z_1$ はOHまたはC末端保護基である)で示されるペプチドを、基質成分とアミン成分との酵素の存在下に反応させ、ついで所望により任意の末端保護基を切断して、式



で示されるペプチドに導くことによって製造する方法において、アミノ酸エステル、ペプチドエステル、デアシペプチドまたはNが置換されていてもよいアミノ酸アミド、またはN末端が保護されていてもよい式



(式中、 $A_1$ は先に定義したとおりであり、 $R_1$ はアルキル、アリール、ヘテロアリール、アラールキルまたは

アミノ酸残基のニーデスマニノフラグメントであり、 $R_2$ および $R_2'$ はそれぞれ水素、アルキル、アリール、ヘテロアリールまたはアラールキルであり、 $X_1$ はL-アミノ酸残基である)で示されるペプチドから選ばれる基質成分を、式

$H - B_1 - NR_3R_3'$ または $H - B_1 - OR_4$   
(式中、 $B_1$ は先に定義したとおりであり、 $R_3$ および $R_3'$ はそれぞれ水素、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アリール、ヘテロアリールまたはアラールキルであり、 $R_4$ は水素、アルキル、アリール、ヘテロアリールまたはアラールキルである)で示されるNが置換されていてもよいL-アミノ酸アミド、L-アミノ酸またはL-アミノ酸エステルと、酵母もしくは動物、植物または他の微生物起原の酵素、L-特異性セリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼの存在下、pH5~10.5の水性溶液または分散液中、好ましくは20~50℃で反応させることを特徴とする方法が記載されている。好ましい酵素は酵母からのカルボキシペプチダーゼYであり、以下CPD-Yと呼ぶ(この記号の意味の混乱を避けるために付与するが、上述の記号の意味はEP-B-17485号に用いられた意味と同じではない)。

したがつて、ジペプチドをEP-B-17485号の方法によって製造する場合、基質成分は必ずN末端保護アミノ酸誘導体でなければならないし、構成アミノ酸は必ずL-アミノ酸でなければならない。

特表平1-502158(4)

基質	生成物	収率 (%)
H-Ala-Ala-Ala-OMe	H-Ala-Ala-Ala-LeuNH <sub>2</sub>	80
H-Ala-al-a-Ala-OMe	H-Ala-al-a-Ala-LeuNH <sub>2</sub>	40
H-Ala-Ala-al-a-OMe	H-Ala-Ala-al-a-LeuNH <sub>2</sub>	0

さらに一般的には、基質成分におけるN末端アミノ酸保護の必要性は、ペプチド残基の鎖長が長くなるに従い低下し、3個のアミノ酸からなるペプチド残基では、その種類および配列によつては保護の必要がなくなるといわれている。

これは、Breddam らにより、“Influence of the substrate structure on carboxypeptidase Y catalyzed peptide bond formation”, Carlsberg Res. Commun., 第45巻、361～367頁(1980年12月30日)に例示されていて、Ac-Ala-Ala-Ala-Ala-OMe および H-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-OMe が H-LeuNH<sub>2</sub> と CPD-Y の存在下にカツプリングされ、それぞれ Ac-Ala-Ala-Ala-Ala-LeuNH<sub>2</sub> および H-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-LeuNH<sub>2</sub> が 90% および 80% の収率で得られている。

Breddam らは、CPD-Y触媒ペプチド合成におけるカツプリングの収率に対するアミノ酸のコンフィギュレーションの重要性も検討し、次表のような結果を得ている。表中、Ala は L-アラニンを、al-a は D-アラニンを示している。

条件：基質 2.5 mM, O. 1M KCl, 1 mM EDTA, pH 9.5, CPD-Y 12 μm, O. 2M LeuNH<sub>2</sub>, 反応は 20 分後に停止させた。

表から明らかのように、C末端が H-Ala-Ala-Ala-Ala-OMe のように D 型であるとエステルが反応しないため、ペプチド合成が起こらない。H-Ala-al-a-Ala-OMe のように D-アミノ酸が C 末端の間にあると、反応は起こるがカツプリングの収率は純粋な L-コンフィギュレーションの H-Ala-Ala-Ala-Ala-OMe の場合の 80% に対し 40% に低下する。

さらに、一部のエンドプロテアーゼは、L-コンフィギュレーションを有するある種の N-非保護アミノ酸エステルのオリゴメリゼーションを触媒できることは以前から知られていたが、単純なダイマーではないタペプチドの製造にこれを用いることは、従来試みられたことがない。一般に、このような結果の結果は、一連のオリゴマーの混合物であつて、時には長く、そして單一の生成

物を単離できたとしても生成物沈殿の場合のみであつた。

この理由から、ペプチド合成におけるエンドプロテアーゼの使用は、米国特許第4,086,136号に例示されているように、アミノおよびカルボキシ末端保護出発原料を用いる場合に用されていた。

また、米国特許第3,972,773号に例示されたようにアスバルテートエンドプロテアーゼを使用する場合、また EP-A 1-009585号において

Z-Asp-Phe-OMe-Phe-OMe 鎌の合成に例示されたようにメタロエンドプロテアーゼを使用する場合も、これらの種類の出発原料が必要である。

最後に、D, L; L, D および D, D-コンフィギュレーションのクアステレオマー-ターブペプチドならびにアミノ非保護出発化合物からの B-アミノ酸残基を含むペプチドの合成は、これまでカルボキシペプチダーゼによつては不可能であつたし、一般にどんなタンパク分解酵素(分類 EC 3, 4)でも可能ではなかつた。別の分類の酵素、たとえば EP-A 1-086053号に例示されているようなアミノアシル-t-RNA-シンテターゼ(分類 EC 6, 1)である努力が行われたことはある。この場合には、アミノ酸残基の各タイプ毎に特定の酵素を使用しなければならないし、さらに ATP のような高価な補因子が必要である。しかも、収率は低く、ある種の生成物が単離され固定されたとしても、通常 1.0 ルの過剰の補因子、100 倍過剰の求核試薬、濃度で 1.0

00 倍まで過剰の酵素が必要であつた。

本発明は、近くべきことに、EP-B 1-17485 号に用いられたセリンおよびチオールカルボキシペプチダーゼが、タペプチドおよびタペプチド誘導体の合成のための翻訣反応における基質成分として N-非保護アミノ酸エステルを使用できること、そして基質のオリゴメーションの可能性を抑えることが可能なことを発見したものである。

さらに近くべきことに、これらの反応では、D-コンフィギュレーションの N-非保護アミノ酸誘導体を基質として使用することも可能で、L, L-タペプチドのはか D, L-タペプチドも合成できることが明らかにされた。D 基質の反応速度は均一な条件では L-基質の反応速度に比べてやや低いが、以下に例示するように、相当する N-保護アミノ酸エステルの場合の D-基質が L-基質の反応速度よりはるかに低速度でしか反応しないのに比べて、反応速度の差ははるかに小さい。収率は以下の例に示すように、非保護 L-基質の場合に比べて非保護 D-基質はほぼ同じか、わずかに高い。

さらにもつと近くべきことに、この製造の基質とは、D-コンフィギュレーションの求核試薬は、他の場合には合成点のアミノ側で L-特異的であることが知られていたこれらの酵素によつてカツプリングできることが明らかにされた。この方法で導入されるアミノ酸エステルは加水分解されない。

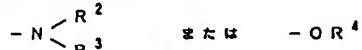
特表平1-502158(5)

含まれてもよいし、求核試験成分中にD型で存在してもよい。

上述の公知の方法に対する本発明の方法の利点は、側鎖保護基を最小または不要とし、基質成分はD-およびL-コンフィギュレーションのいずれでもよく、保護は必要なく、ラセミ化の危険がなく、合成工程は少なく、比較的純粋な最終生成物が期待でき、これらの結合により短く確実で、経済的な製造方法を与えることである。

好ましい基質成分は、R<sup>1</sup>が1個から6個までの炭素原子を有する直鎖状もしくは分枝状アルキルたとえばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、アミルおよびヘキシル、またはアラールキルたとえばベンズルであるエステルである。とくに適当な求核性成分は、R<sup>2</sup>がHでR<sup>3</sup>がHもしくはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルである遊離L-アミノ酸もしくはアミノ酸アミド、またはR<sup>4</sup>が1個から6個までの炭素原子を有する直鎖状もしくは分枝状のアルキルたとえば上述の基のアミノ酸エステルである。上述のように、アルキル、アリールまたはアラールキルであつて、不活性置換基たとえばヒドロキシまたはニトロで任意に置換されていてもよい。

本発明はまた、基



または  $-\text{OR}^4$

が含有するペプチドを中間的に形成し、ついでこの基を

したがつて、本発明の方針は、請求の範囲第1項の特徴部の定義によつて特徴づけることができるものである。

有用なアミノ酸の例には、モノアミノモノカルボン酸たとえばグリシン(Gly)、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ノルバリン(Nva)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Iso-Leu)およびノルロイシン(Nleu)、ヒドロキシアミノ酸たとえばセリン(Ser)、スレオニン(Thr)およびホモセリン(homo-Ser)、合成人アミノ酸たとえばメチオニン(Met)またはシスチン(Cys)およびシステイン(Cys-H)、モノアミノジカルボン酸たとえばアスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)およびそれらのアミドたとえばアスパラギン(Asn)およびグルタミン(Gln)、ニアミノモノカルボン酸たとえばオルニチン(Orr)およびリジン(Lys)、アルギニン(Arg)のような脂肪族アミノ酸、フェニルアラニン(Phe)およびチロシン(Tyr)のような芳香族アミノ酸、ならびにヒスチジン(His)、プロリン(Pro)およびトリiptофアン(Trp)のような異常アミノ酸がある。もつと例外的な有用なアミノ酸の例としては、ペニシラミン(Pen)、アミノホスホン酸たとえばアラニンホスホン酸(AlaP)、アミノスルホン酸たとえばタウリン(Tau)、ω-アミノ酸たとえばβ-アラニン(BA Ala)を挙げることができる。上述のように、これらは基質成分中にD型で包

除去してカルボキシル酸基を形成することを包含する方法である。この除去はペプチドの形成に使用したのと異なるまたは同じ酵素を触媒とすることができます。

酵素はまた、側鎖保護基の切断にも使用できる。通用できる酵素は、その保護基の性質に応じて、タンパク分解酵素、リバーゼおよびエステラーゼである("The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 9, Special Methods in peptide Synthesis Part C, J. A. Glaas, Enzymatic manipulation of Protecting Groups in Peptide Synthesis, Academic Press 1987, 参照)。

本発明の方法は、CPD-Yを用いて実施することができる。これは現在のところ好ましい酵素であり、EP-B1-17485号に詳細に特徴が述べられている。また、他のセリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼ、たとえば以下の一覧表に示す酵素も、これらはアシル酵素中間体を介して共通の活性機構を有するので、本発明の方針に使用できる。

酵 素 起 原

酵 素	起 原
ペニシロカルボキシペプチダーゼ	Penicillium
S-1	Janthinellum
-S2	-
カルボキシペプチダーゼ	Aspergillus
	saltol
-	Aspergillus
	oryzae
	植 物
カルボキシペプチダーゼC	オレジンの皮
	オレンジの皮
カルボキシペプチダーゼCN	Citrus natsudaidai
	Hayata
ファセオリン	豆の葉
カルボキシペプチダーゼ	発芽大麦またはモルト
	ワタの胚芽
	トマト
	スイカ
プロメリン(パイナツ フル)末	プロメリン(パイナツ フル)末

特表平1-502158(6)

上述のカルボキシペプチダーゼ間の近接関係については Kubotaら : Carboxypeptidase C. J. Biochem., 74 : 757~770 (1973) に記載されている。モルト、小麦および他の原料からのカルボキシペプチダーゼについては Breddam : Carlsberg Res. Comm., 51 : 83~128 (1966) に述べられている。

使用されるカルボキシペプチダーゼは化学的に修饰されたもの、または天然型の生合成異体であつてもよい。

以下にさらに詳細に例示するように、本発明の方法はかなり単純ではあるが、反応混合物のpH値はかなり一定に保持することが重要である。このpH値は5~10.5であるが、好ましくは7~9.5で、また具体的な出発原料、生成するペプチドおよび酵素によつて変動する。

反応は水性反応メタクム中で実施されるが、所望により、水に混和性または非混和性で、特定の条件下で酵素と適合性のある有機溶媒70%までを含有させることができる。好ましい溶媒は低級アルコール、グメチルホルムアミド、グメチルスルホキシド、グメトキシエタン、エチレンクリコールおよび酢酸エチルである。

反応濃度は室温およびそれ以上、20~50°Cが好ましいが、他の条件下の方が有利な場合は0~60°Cの範囲の温度も使用できる。

2つの反応成分の濃度は、広い範囲内で変化させることができると、多くの場合、求核試薬成分は過剰とし、基質成分はそのオリゴメリゼーションを避けるために全

反応期間中に順次をおいて少量ずつ加えることが多い。使用するエステルがエチルまたはより高級な場合には更くべきことにオリゴメリゼーションは起こらず、副反応を伴わないので高い基質濃度を使用することができる。

A-Bのホモペプチドを唯一の出発化合物から、オリゴメリゼーションを起こすことなく生成させるには、このエステルの加水分解により求核性成分を *in situ* で生成させる。これは場合により、さらに技術的な利点がある(第2回参照)。

基質成分の最初の濃度は通常0.005~2モルであり、求核性成分は別個に添加する場合0.005~3モルである。多くの場合、過剰の求核性成分、および基質成分からの加水分解生成物は回収でき、必要に応じて再エステル化して再使用できる。内成分の低濃度は、その構造が簡単で、副反応および脱保護による喪失がないのでとくに容易である。

酵素濃度も同様に広く変動させができるが、多くの場合、N保護アミノ酸エステル基質を使用するとときの適当な濃度よりいくらか高く(5~50μM)する。しかしながら、以下の実施例に例示するように、合成の目的で必要な量は安定な固定化酵素アレバレーションを使用することにより10分の1以下に低減でき、またこれにより酵素を連続過程で使用することが可能になる。

反応メタクムには、酵素の基質への結合に影響する塩、たとえば食塩、ならびに酵素を安定化するために存在す

る金属イオンの複合結合剤たとえばEDTAを含有させることもできる。

最初に述べたD-およびL-基質間での反応速度の差は第1図に例示する。第1図は保護および非保護アミノ酸エステル(Tyr-OEt) D-およびL-型のCPD-Y加水分解に対する反応順序を示している。

図から明らかのように、L-ACTYrOEtはほとんど即時に加水分解されるが、D-ACTYrOEtでは2時間後にも有意でない加水分解(5%未満)が起こっているにすぎない。

これに対して、非保護エステルのL-およびD-型の差はわずかである。

この差くべき加水分解順序は、酵素CPD-YおよびモルトカルボキシペプチダーゼII(CPD-MII)、小麦カルボキシペプチダーゼ(CPA-W)を用いて本発明の方法による各種ジペプチドの製造を例示した以下の実施例に明らかである。

例1~15の一般的な方法

反応容器1#の分析規模で実施した反応はpHスタット中で行い、選択したpH値は1N NaOHの自動添加によって一定に保持した。反応濃度はとくに指示のない限り室温とした。表には、反応濃度、有機溶媒含量、生成物および收率も掲げる。反応時間は通常0.5~5時間、酵素濃度はとくに指示のない限り通常10~20μMである。

生成物の同定および生成物の收率の決定は、C<sub>18</sub>NOVA PAKカラム(Waters, RCM)上、50mHトリエチルアンモニウムホスフェート、pH3.0、0~80%アセトニトリルを含有する適当な勾配溶出系を流速2ml/分で用いる逆相HPLC(Waters 600OAポンプ、660勾配ブレンダー、UK 6インジクター)により実施した。溶出はUV検出器(Waters 480)により、230nm、254nm、278nmまたは290nmで実施した。

生成物は、推定される生成物ピークに相当するHPLC分析分画のアミノ酸分析および/または化学的に合成した標準生成物とのHPLC比較によって同定した。標準生成物は公知の原理に従い、通常、BOC-A-OSuなどの保護アミノ酸のtert-ブチルオキシカルボニル-コハク酸イミドエステル誘導体と使用される求核性成分との間の反応、ついでN末端アミノ酸残基の脱保護により製造した。いずれの場合も、ジアステロマー-DL-およびLD-ジペプチド生成物からL-L-およびDD-ジペプチドを分離することができた。

230nmでしか検出できない生成物については、生成物の收率は、化学的に合成した標準化合物の吸収/濃度曲線によって決定した。他の生成物については、生成物または反応原料が吸収を示す波長に相当する溶出クロマトグラムのピーク下の積分面積の比に基づいて決定した。

製造例16~21の反応条件は各例に記載する。反応

特表平1-502158(7)

は上述のように分析HPLCで追跡した。相当する分析例に比べて酵素濃度は一般に低く、反応時間は短いが、反応条件を至適化する試みはなされていない。

## 例1

基質成分としてL-チロシンエチルエステル(50 mM)、求核試薬として過酸アミノ酸によるL-L-ジペプチドのカルボキシペプチダーゼY<sup>a)</sup>触媒合成

求核試薬	(濃度)	溶媒	pH	生成物	収率%
アラニン	(1.9M)	水	9.5	TyrAlaOH	10
アルギニン	(0.8M)	水	9.5	TyrArgOH	31
システイン	(1M)	水	8.0	TyrCysOH	30
DL-システィン	(2M)	水	8.0	TyrCysOH(LL)	40
ロイシン	(0.2M)	水	8.0	TyrLeuOH	1
リジン	(2M)	水	9.5	TyrLysOH	18
メチオニン	(0.3M)	水	8.0	TyrMetOH	8
メチオニン	(0.3M)	水	9.0	TyrMetOH	9
メチオニン	(0.3M)	DMSO	9.0	TyrMetOH	15
メチオニン	(0.3M)	EtOH	9.0	TyrMetOH	7
グルタミン	(0.8M)	水	9.5	TyrGlnOH	8
ベニシラミン	(0.5M)	水	8.0	TyrPenOH	7

a) 10μM, 1M EDTA

## 例2

求核性成分としてのL-メチオニン(0.3M)によるpH9.0の水中でのL-L-ジペプチドのカルボキシペプチダーゼY<sup>a)</sup>触媒合成

基質(50mM)	生成物	収率%
ロイシンメチルエステル	LeuMetOH	30
ロイシンイソプロピルエステル	LeuMetOH	36
メチオニンエチルエステル <sup>b)</sup>	MetMetOH	25
フェニルアラニンメチルエステル	PheMetOH	16
フェニルアラニンエチルエステル	PheMetOH	19
フェニルアラニンイソプロピルエステル	PheMetOH	23
セリンイソプロピルエステル <sup>c)</sup>	SerMetOH	21
トリプトファンメチルエステル	TrpMetOH	26
チロシンベンジルエステル <sup>d)</sup>	TyrMetOH	19

a) 10μM, 1M EDTA, b) 5M,

c) 反応時間>20時間, d) 30%DMSO

## 例3

基質成分としてL-チロシンエチルエ斯特ル(50 mM)、求核試薬としてL-アミノ酸アミドまたはエステルを用いるL-L-ジペプチドのカルボキシペプチダーゼY<sup>a)</sup>触媒合成

基質	求核試薬	(濃度)	溶媒	pH	生成物	収率%
TyroEt ロイシンアミド	(0.2M)	30%	DMSO	9.5	TyrLeuNH <sub>2</sub> <sup>b)</sup>	42
					TyrLeuOH	4
TyroEt リジンアミド	(0.3M)	水	9.5	TyrLysNH <sub>2</sub>	20	
					TyrLysOH	22
TyroEt アルギニンアミド	(0.2M)	水	9.0	TyrArgNH <sub>2</sub>	50	
TyroEt パリンアミド	(0.3M)	水	9.0	TyrValNH <sub>2</sub>	77	
TyroEt ロイシンメチルエ斯特ル	(0.2M)	DMSO	9.0	TyrLeuOH	6	

a) 20μM, 1M EDTA

b) 反応時間>20時間、50%の基質が反応

## 例4

単一の出発化合物から、pH8.5の水中でのL-L-ホモペプチドのカルボキシペプチダーゼY<sup>a)</sup>触媒合成

基質	(濃度)	生成物	収率%
メチオニンメチルエ斯特ル	(0.5M) <sup>b)c)</sup>	MetMetOH	14
メチオニンエチルエ斯特ル	(0.5M)	MetMetOH	16
メチオニンイソプロピルエ斯特ル	(0.5M)	MetMetOH	14
チロシンメチルエ斯特ル	(0.2M)	TyrTyrOH	1
チロシンエチルエ斯特ル	(0.2M)	TyrTyrOH	1
フェニルアラニンメチルエ斯特ル	(0.2M) <sup>b)e)</sup>	PhePheOH	2
アラニンアミド	(0.2M) <sup>f)d)</sup>	AlaAlaNH <sub>2</sub> <sup>b)</sup>	

a) 10μM CPD-Y, 1M EDTA,

b) 置換, c) 沈殿, d) pH9.0, e) 30% DMSO,

f) 50μM CPD-Y, 1M EDTA

## 例5

基質としてD-チロシンエチルエ斯特ル(50 mM)および求核試薬として過酸L-アミノ酸を用い、水中での、D-L-ジペプチドのカルボキシペプチダーゼY<sup>a)</sup>触媒合成

特表平1-502158(日)

求核試薬	(濃度)	pH	生成物	收率%
アルギニン	(1M)	9.0	tyrArgOH	75
システィン	(1M)	8.0	tyrCysOH	86
LD-システィン	(2M)	8.0	tyrCysOH(DL)	45
ロイシン	(0.2M)	8.0	tyrLeuOH	22
メチオニン	(1M)	9.0	tyrMetOH	65
ベニシラミン	(1M) <sup>b)</sup>	8.0	tyrPenOH	27

a) 10μM, 1M EDTA

b) 反応時間&gt;20時間

## 図6

求核性成分としてL-メチオニン(0.3M)を用い、  
pH9.0、水中でのD,L-ジペプチドのカルボキシペ  
チダーゼY<sup>a)</sup>触媒合成

D-基質(50μM)	生成物	收率%
ロイシンメチルエステル	leuMetOH	50
ロイシンイソプロピルエステル	leuMetOH	71
メチオニンエチルエステル	metMetOH	68
フェニルアラニンエチルエステル	pheMetOH	71
フェニルアラニンイソプロピルエステル	pheMetOH	72
セリンイソプロピルエステル	sorMetOH <sup>b)</sup>	46
トリプトファンエチルエステル	trpMetOH	72

a) 15μM, 1M EDTA, b) 反応時間=5日

## 図7

基質成分としてD-チロシンまたはD-フェニルアラ  
ニンエチルエ斯特ル、求核性成分としてL-アミノ酸ア  
ミドを用い、水中でのD,L-ジペプチドアミドのカル  
ボキシペチダーゼY<sup>a)</sup>触媒合成

基質	求核試薬	(濃度)	pH	生成物	收率%
tyroEt ロイシンアミド	(0.2M)	9.0	tyrLeuNH <sub>2</sub>	82	
				tyrLeuOH	2
tyroEt バリンアミド	(0.3M)	9.0	tyrValNH <sub>2</sub>	94	
tyroEt アルギニンアミド	(0.2M)	9.0	tyrArgNH <sub>2</sub>	86	
PheEt アラニンアミド	(0.8M)	9.0	PheAlaNH <sub>2</sub> <sup>b)</sup>	50	

a) 15μM, 1M EDTA

b) 一部重合が認められる

## 図8

D-基質エステル成分を求核性成分としても作用させ、  
pH9.0、水中でのD,D-ホモペプチドエステルのカ  
ルボキシペチダーゼY<sup>a)</sup>触媒合成

D-基質	(濃度)	生成物	收率%
チロシンエチルエステル	(0.05M)	tyrtyrOEt	9
フェニルアラニンエチルエステル	(0.1M)	phepheOEt	10
チロシンエチレングリコールエステル	(0.05M)	tyrtyrOEtOH	1
メチオニンメチルエステル	(0.1M)	metmetOH	3

a) 15μM, 1M EDTA

## 図9

基質成分としてL-TyroEt(50μM)、求核試  
薬として側鎖保護L-アミノ酸およびアミドを用いた側  
鎖保護カルボキシ末端アミノ酸のL,L-ジペプチドの  
カルボキシペチダーゼY<sup>a)</sup>触媒合成

特表平1-502158(9)

求核性試薬	(濃度)	pH	溶媒	生成物	収率%
アセキミドメチル システィン	(1M)	8.5	水	TyrCys(-SAc) <sub>m</sub> OH	10
アセキミドメチル システィンアミド	(0.4M)	8.5	水	TyrCys(-SAc) <sub>m</sub> NH <sub>2</sub>	12
				TyrCys(-SAc) <sub>m</sub> OH	1
$\beta$ -ベンジル アスパラギン酸	(0.1M) <sup>b)</sup>	9.0	30% DMSO	TyrAsp(OBz) <sub>2</sub> OH	13
$\epsilon$ -トリフルオロ アセチルリシン	(0.1M) <sup>b)</sup>	8.5	30% DMSO	TyrLys(Tfa)OH	12
$\gamma$ -tert-ブチル グルタミン酸アミド	(0.1M) <sup>b)</sup>	8.0	30% DMSO	TyrGlu(OtBu)NH <sub>2</sub>	3
				TyrGlu(OtBu)OH	12
$\gamma$ -メチル グルタミン酸	(0.3M)	8.5	水	TyrGlu(OMe)OH	20
$\gamma$ -エチル グルタミン酸	(0.3M)	8.5	水	TyrGlu(OEt)OH	18

a) 10μM、1m EDTA

b) 25m 濃度、20μM

例 1.0

基質成分として D-Tyr(OEt) (50 mM)、求核試薬として側鎖保護 L-アミノ酸およびアミドを用いた側鎖保護カルボキシ末端アミノ酸のカルボキシペプチダーゼ Y<sup>a)</sup>触媒合成

求核性試薬	(濃度)	pH	溶媒	生成物	収率%
アセキミドメチル システィン	(1M)	8.5	水	tyrCys(-SAc) <sub>m</sub> OH	75
アセキミドメチル システィンアミド	(0.4M)	8.5	水	tyrCys(-SAc) <sub>m</sub> NH <sub>2</sub>	71
				tyrCys(-SAc) <sub>m</sub> OH	6
$\beta$ -ベンジル アスパラギン酸	(0.1M) <sup>b)</sup>	9.0	30% DMSO	tyrAsp(OBz) <sub>2</sub> OH	54
$\epsilon$ -トリフルオロ アセチルリシン	(0.1M) <sup>b)</sup>	8.5	30% DMSO	tyrLys(Tfa)OH	51
$\gamma$ -tert-ブチル グルタミン酸アミド	(0.1M) <sup>b)</sup>	8.0	30% DMSO	tyrGlu(OtBu)NH <sub>2</sub>	42
				tyrGlu(OtBu)OH	10
$\gamma$ -メチル グルタミン酸	(0.3M)	8.5	水	tyrGlu(OMe)OH	75
$\gamma$ -エチル グルタミン酸	(0.3M)	8.5	水	tyrGlu(OEt)OH	71

a) 10μM、1m EDTA

b) 25m 濃度、20μM

例 1.1

側鎖保護基質成分 (25 mM) からの側鎖保護アミノ末端アミノ酸残基と求核成分として L-メチオニン (0.3 M)、pH 9.0、30% DMSO 中での L-カーボペプチドのカルボキシペプチダーゼ Y<sup>a)</sup>触媒合成

基質	生成物	収率%
L-アスパラギン酸ジベンジルエステル <sup>b)</sup>	Asp(OBz) <sub>2</sub> MeOH	65
L-グルタミン酸ジベンジルエ斯特ル	Glu(OBz) <sub>2</sub> MeOH	70

a) 20μM、1m EDTA、反応時間 > 20時間

b) 35% 变換において

c) 60% 变換において

例 1.2

L-および D-アミノ酸エ斯特ル基質を水中 50 mM な  
らびに求核試薬として  $\beta$ -アラニンおよび  $\beta$ -アラニン  
アミドからの  $\omega$ -アミノ酸含有カーボペプチドエ斯特ルおよ  
びアミドのカルボキシペプチダーゼ Y<sup>a)</sup>触媒合成

特表平1-502158(10)

基質	求核試薬	(濃度)	pH	生成物	収率%
tyroOEt	B-アラニンメチルエステル (0.2M)	8.5	tyrBAlaOMe	51	
tyroOEt	B-アラニンメチルエ斯特ル (0.5M)	8.5	tyrBAlaOMe	72	
pheOEt	B-アラニンメチルエ斯特ル (0.5M)	9.0	pheBAlaOMe	83	
PheOEt	B-アラニンメチルエ斯特ル (0.5M)	9.0	PheBAlaOMe	15	
pheOEt	B-アラニンアミド	(0.5M)	9.0	pheBAlaNH <sub>2</sub>	70
PheOEt	B-アラニンアミド	(0.5M)	9.0	PheBAlaNH <sub>2</sub>	3

a) 20μM, 1M EDTA

## 例1-3

基質成分としてL-およびD-チロシンならびにL-フェニルアラニンのヒドロキシアルキルエ斯特ル (50 mM) と、求核試薬として遊離L-メチオニン (0.3 M)、pH 9.0、水/エチレングルコール中からのL-およびD-L-ジペプチドのカルボキシペプチダーゼY<sup>a</sup>) による合成

基質	%グリコール(v/v)	生成物	収率%
TyroEtOH	0	TyrMetOH	10
TyroEtOH	40	TyrMetOH	8
TyroEtOH	60 <sup>b</sup>	TyrMetOH	5
tyroOEtOH	0	tyrMetOH	56
PheOEtOH	0	PheMetOH	16

a) 5μM, 1M EDTA

b) 10μM, 1M EDTA

## 例1-4

pH 8.0における水中L-基質エ斯特ル濃度50 mMと求核成分としてL-アミノ酸およびアミドから、大麦および小麦のカルボキシペプチダーゼによるL-L-ジペプチドの合成

酵素	基質	求核試薬	(濃度)	生成物	収率%
CPD-MI <sup>a</sup> )	PheOEt	メチオニン (0.4M)		PheMetOH	10
CPD-W <sup>b</sup> )	PheOEt	アルギニン (0.8M)		PheArgOH	8

a) 20μM, 1M EDTA, 2M NaCl

b) 10μM, 1M EDTA

## 例1-5

pH 8.0における水中D-フェニルアラニン初期濃度50 mMと、求核成分としての遊離L-アミノ酸から、大麦および小麦のカルボキシペプチダーゼによるD-L-ジペプチドの合成

酵素	基質	求核試薬	(濃度)	生成物	収率%
CPD-MI <sup>a</sup> )	pheOEt	メチオニン (0.4M)		pheMetOH	15
CPD-W <sup>b</sup> )	pheOEt	アルギニン (0.8M)		pheArgOH	13
CPD-W <sup>b</sup> )	pheOEt	メチオニン (0.4M)		pheMetOH	40

a) 20μM, 1M EDTA, 2M NaCl

b) 10μM, 1M EDTA, 2M NaCl, 反応時間>20時間,  
温度 50%未満

## 例1-6

L-L-チロシルシステイン TyrCysOH の製造  
の合成

## 操作

L-チロシンエチルエ斯特ル溶液 (1.5 g, 6ミリモル) とL-システイン (1.5, 2 g, 12.5ミリモル) を1M EDTA含有0.1M KCl溶液11.0 mLに溶解した。pHをトリエチルアミンで8.0に調整した。カルボキシペプチダーゼY溶液 (16 mM/2.75 mL) を加えて反応を開始させ、反応期間中、窒端で搅拌を続けるながらトリエチルアミンを添加してpHを8.0に保持した。基質の残部 (13.5 g, 54ミリモル) は1.5 gずつ1時間で添加した。0.5時間後チロシンの沈殿が始まり、3.5時間後には4.5 mLに20分間加热して反応を停止した。

生成したチロシンを滤去し、滤液を60 mM C<sub>18</sub>-粒子を充填したカラム (5.7 × 30 cm) 2本と用出波として50 mM酢酸を用いてR-固相HPLC (Waters Prep. LC/Systems 500 A) により精製した。純粋な生成物を含む分画を集め、振り返し蒸水エタノールを添加して真空中で蒸発乾固した。残留物をクエチルエーテルと搅拌した。洗いて、3.88 gのL-L-チロシンクシステイン (14ミリモル、22%) が通過および乾燥によって単離された。

## 固定

特表平1-502158 (11)

塩化物および酢酸塩は検出されず、生成物は両性イオンとして存在した。

追加水分解およびCysのアクリロニトリルによる試験体化後、アミノ酸分析の結果は次のとおりであつた。

Tyr (1.00)

Cys (1.08)

純度

システィン側鎖のアクリロニトリルによる試験体化後、シリカゲル60-F上、ニンヒドリン検出を用いた TLCで唯一のスポットのみが検出された (Rf 0.73)。溶出液：酢酸エチル、アタノール、酢酸および水 (1:1:1:1)。

HPLC-純度：99.5% (ヌクレオシド7 C<sub>18</sub>、0.1Mアンモニウムホスフェート、pH3.0/Aセトニトリル、220nm)  
UV-定量：98.5% (293nm, 0.1M NaOH中チロシン吸収)

例17

L,L-メチオニン-メチオニンMet Met OHの  
製造的合成

操作

L-メチオニンエチルエステル塩酸塩 (24.6g, 115ミリモル) と L-メチオニン (20.6g, 13.8ミリモル) を、1mH EDTA含有0.1M KCl 溶液190mlに溶解した。pHを水酸化ナトリウム溶液で

9.0に調節し、カルボキシペプチダーゼY溶液 (20mg/ml) 14.2mlを加えて反応を開始させた。反応液を室温で一夜搅拌し、この間pH-スタートにより水酸化ナトリウム溶液を添加してpHを9.0に保持した。反応終了時に、HCl-溶液でpHを3.0に調整した。

沈殿したメチオニンを滤去し、残液を例16に記載したようにして R-製造HPLCで精製した。純粋な生成物を含む分画を集め、観察させて確認し、最後に液相乾燥した。この操作で L-メチオニル-L-メチオニン 10.6g (37.8ミリモル、33%) が無定形の粉末として得られた。

固定

塩化物は検出されず、酢酸塩 1.9% (w/w) のみが定量され、生成物は大部分両性イオンの形であつた。追加水分解後のアミノ酸分析ではメチオニンが認められ、加水分解しないサンプルには遊離のメチオニンは存在しなかつた。

純度

HPLCによる純度：99.8% (ヌクレオシド7 C<sub>18</sub>、0.1Mアンモニウムホスフェート、pH3.0/Aセトニトリル、220nm)

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS)との反応およびUV-検出による定量：92.5%

カールフィッシャーによる水含量：1.5%

例18

Tyr (1.01)

Vai (0.99)

純度

HPLC-純度：99.5% (Novapak C<sub>18</sub>、0.1Mアンモニウムホスフェート含有アルキルスルホネート、pH4.5/Aセトニトリル、220nm)

UV-定量：97.8% (293nm, 0.1M NaOH中チロシン吸収)

例19

D,L-チロシル-アルギニンD,L-tyrArg OHの製造的合成

L-アルギニン105g (105g, 603ミリモル) を水400mlに溶解し、pHをHCl-溶液で9.0に調節した。D-チロシンエチルエステル塩酸塩 (6.1g, 25ミリモル) および0.1M EDTA 5mlを加え、pHを再び9.0に調整した。カルボキシペプチダーゼY溶液 (20mg/ml) 7mlを加えて反応を開始させ、pHはNaOH溶液の添加によって9.0に保持した。4時間後にはHCl-溶液でpHを3に調整して反応を停止させた。

反応混合物を希釈し、Dowex A 650W×4カラム上、酢酸アンモニウム塩勾配を用いて陽イオン交換により精製し、最後に脱塩した。生成物の分画を集め、観察させて確認し、最後に液相乾燥すると、D,L-チロシル-アルギニン6.45g (19ミリモル、77%) が白色の粉末として得られた。

L,L-チロシルバリンアミドTyrValNH<sub>2</sub>の  
製造的合成

操作

L-チロシンエチルエステル塩酸塩 (16.0g, 6.5ミリモル) およびL-バリンアミド塩酸塩 (6.0g, 3.90ミリモル) を水1150mlに溶解し、20mM DMDTA 6.5mlを加えた。pHを水酸化ナトリウム溶液で9.0に調整し、カルボキシペプチダーゼY溶液 (20mg/ml) 12mlを加えて反応を開始した。反応液を室温で4時間搅拌し、pHは水酸化ナトリウム溶液を添加して9.0に保持した。反応が完結したのち、pHを1.1に上昇させて反応を停止させた。

酸性醇素を滤去し、反応混合物を希釈し、透析的に Dowex A 61×4カラム上陽イオン交換およびDowex A 650W×4カラム上陽イオン交換を行い、それぞれ酢酸ナトリウムおよびアンモニウム塩勾配を用いて溶出して精製し、最後に脱塩した。生成物の分画を合し、真空下、繰り返し無水エタノールを添加して蒸発乾燥すると、L,L-チロシルバリンアミド 11.2g (40ミリモル、62%) が白色粉末として得られた。

固定

1.8% (w/w) の酢酸塩が検出された。生成物は大部分両性イオン型であつた。

追加水分解後のアミノ酸分析では、以下の結果が得られた。

特表平1-502158(12)

固定  
酢酸塩および塩化物は検出されず、生成物は両性イオンとして存在した。

酸加水分解後のアミノ酸分析では、以下の結果が得られた。

Aro (1. 03)  
Tyr (0. 97)

純度

HPLC - 純度: 99. 5% (Novapak C<sub>18</sub>、0. 1 M アンモニウムホスフェートとアルキルスルホン酸、pH 4. 5 / アセトニトリル、220nm)

カールフィッシャーによる水含量: 3. 4%

例20

固定化カルボキシペプチダーゼYを用いたD,L-フェニルアラニルメチオニン-D,L-phe-MetOHの製造的合成

固定化操作

カルボキシペプチダーゼYを、製造者の建議する操作に従つて Eupergit C に固定化した。固定化はリン酸塩緩衝液中、pH 7. 5において行い、残った活性グル基は pH 8. 0においてエタノールアミンによって遮断し、ついで洗浄した。

酵素の93%がグルに結合し、2. 5 mM タンパク質/ugを含有した。酵素がカップリングしたEupergit C は 10mM PIPES、1mM EDTA、0. 05%ヒド

生成物の固定

生成物は塩化物を含まなかつたが、酢酸塩7. 0% (v/v) を含有し、一部が酢酸塩型であつた。

アミノ酸分析では、遊離アミノ酸は存在せず、加水分解後には以下の比が得られた。

Met (0. 98)  
Phe (1. 03)

ナトリウムのD線を用い、25℃、水中 C = 0. 25 の旋光度は -128. 9° であつた。

生成物の純度

HPLC: 99. 6% (ヌクレオシド7 C<sub>18</sub>、0. 1 M アンモニウムホスフェート、pH 3 / アセトニトリル、220nm)

カールフィッシャーの水含量: 2. 8%

例21

D,D-フェニルアラニルフェニルアラニンエチルエスチル粗製塩、D,D-phepheOEt・HClの製造的合成

操作

D-フェニルアラニンエチルエスチル粗製塩 (2. 5 g、1. 1ミリモル) を水45mlに溶解し、0. 1N EDTA 0. 5 mlを加えた。pHを水酸化ナトリウムで9. 0に調整し、当該は最初一部始状の崩壊液として存在した。カルボキシペプチダーゼY溶液 (20mg/ml) 3. 4mlを加えて反応を開始し、室温で2. 5時間搅拌

ロキシ安息香酸エチルエステル、pH 7. 0中、4℃で保存した。

合成分析

D-フェニルアラニンエチルエスチル粗製塩 (5. 7 g、2. 5ミリモル) およびL-メチオニン (29. 8、200ミリモル) を水400mlに溶解し、0. 1N EDTA 5mlを加え、水酸化ナトリウム溶液でpHを9. 0に調整し、反応容器を500mlとした。反応混合物を絶えず搅拌し、水酸化ナトリウム溶液でpHを9. 0の一一定に保持し、この間溶液は固定化CPD-Yのカラム上に速度3ml/minで留出させた。上述のようにして固定したEupergit C 上に固定化CPD-Yを含有するカラムは2. 5cm×5. 5cm、容量27ml、計67mlのCPD-Yを含有した。精製を10時間続けたのち、pHをHCl溶液で7に調整し、生成物は例16に記載したR-製造HPLCによつて精製した。

純粋な生成物を含む分画を合し、真空中で蒸発させ、最後に再結乾燥すると、D,L-フェニルアラニルメチオニン3. 5g (1. 2ミリモル、48%) が白色無定形粉末として得られた。

酵素プレバレーションの安定性

同じ酵素グルプレバレーションを数回反復使用して実験を行つても、変換率に明らかな低下はなく、相当する結果が得られた。したがつて、酵素は反応条件下においてかなり安定で、さらに過程の経済性が改良された。

し、水酸化ナトリウム溶液を加えてpHを9. 0に保持した。HCl溶液でpHを3に調整して反応を停止させた。

反応混合物を过滤し、例16に記載したようにR-製造HPLCによつて精製した。

生成物の分画を集めて真空中で蒸発させて調査し、HCl溶液を加えて再結乾燥すると、生成物0. 49g (1. 3ミリモル、12%) が白色無定形の粉末として得られた。

固定

生成物は、クロリド9. 2% (v/v) を含有し、酢酸塩は存在しなかつた。生成物は塩酸塩として存在した。

アミノ酸分析では酸加水分解後にフェニルアラニンが認められ、酸加水分解前にはフェニルアラニンはみられなかつた。

生成物は塩基でさらに加水分解され、D,L-PhePheOEtとはクロマトグラフィーで異なる生成物を与えた。この生成物自体は、使用したHPLC系でL,L-PhePheOEt標準と共に溶出した。

最後に、ナトリウムD線を用い、25℃、浴槽中C=0. 5で比旋光度を測定したところ、-42. 7° であった。比較のため純粋なし、L-Phe-PheOEtの標準についても同じ条件で測定したところ、+52. 1° の値が得られた。この場合の矛盾は、合成したペプチドの純度が低いことによると考えられる。

純度

HPLC 種度: 82.3% (ヌクレオシド7 C<sub>18</sub>, 0.1M アンモニウムホスフェート、pH3/アセトニトリル、220 nm)

検出された不純物は、目的、目的加水分解物、生成物加水分解物またはそれらのジアステレオマーと一緒にしなかつた。

カールフィツシャーによる水含量: 7.5%

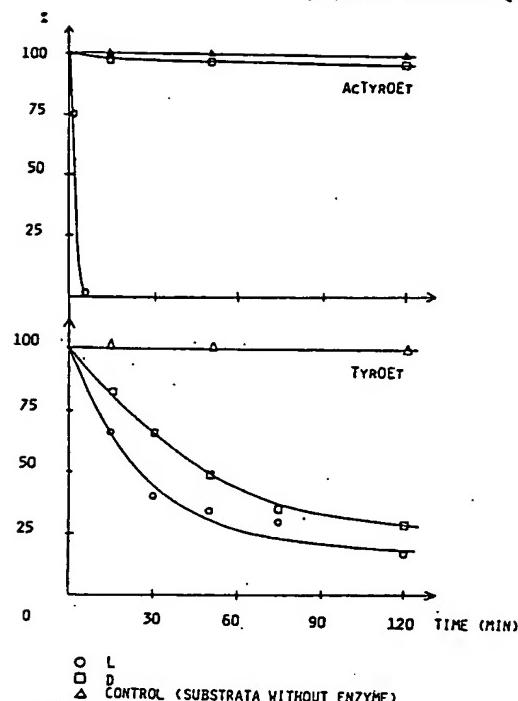


FIGURE 1  
Carboxypeptidase Y (10  $\mu$ M) Catalyzed Hydrolysis  
of L- and D-TyroEt and of L- and D-Acetyltyrosine Ethyl Ester (50 mM). 20%  
DMSO, pH 9.0, 1 mM EDTA

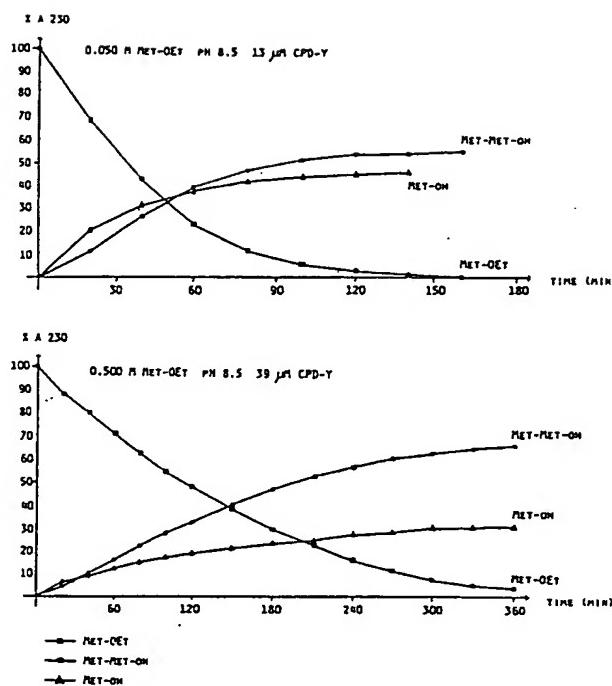


Figure 2  
Carboxypeptidase Y catalyzed formation of the homodipeptide L,L'-Methionyl-L-Methionine from the single starting compound L-Methionine ethylester at 0.2 M and 0.5 M initial concentration, the nucleophile methionine being generated in situ. No oligomerisation is observed.  
1A230 are per cent arbitrary absorbance units at 230 nm with HPLC-detection.

## 手続補正書(自発)

昭和63年11月8日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

件名: 特許出願  
PCT/DK88/00022

2. 発明の名称

ジペプチドの酵素的製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所: カールスバーグ・バイオテクノロジー  
氏名: リミテッド アクチーセルスカブ

4. 代理人

住所: 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビルディング331  
電話: (211) 3651 (代表)  
氏名: (6669) 浅村



5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明細書及び請求の範囲翻訳文



8. 補正の内容 別紙のとおり  
明細書及び請求の範囲翻訳文の添付  
(内容に変更なし)

方言

特表平1-502158(14)

## 手 続 補 正 書 (自 発)

昭和63年7月8日

補正書の翻訳文提出書 (特許法第184条の7第1項)

昭和63年10月12日

特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

特許出願番号  
PCT/DK88/00022

## 2. 発明の名称

ジペプチドの酵素的製造方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所  
氏名 カールスバーグ バイオテクノロジー  
(名称) リミテッド アクチーセルスカブ

## 4. 代理人

住所  
氏名 (6669) 渡 村 皓

## 5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

## 6. 補正により増加する発明の数

## 7. 補正の対象

補正書の翻訳文

8. 補正の内容 別紙のとおり  
補正書の翻訳文の添書  
(内容に変更なし)添書(内容に変更なし)  
補正された請求の範囲

〔国際事務局により1988年7月18日(18.07.88)受領された。原請求の範囲第1項および第10項が補正された。他は変更なし(5頁)〕

## (1) (補正) 一般式



(式中、Aは側鎖が保護されていてもよいL-もしくはD-α-アミノ酸残基またはD-β-アミノ酸残基であり、Bは側鎖が保護されていてもよいAと同様もしくは異様のL-もしくはD-α-アミノカルボン酸残基、L-もしくはD-アミノホスホン酸残基またはL-もしくはD-アミノスルホン酸残基、または相当するD-アミノ酸、またはその塩および水和物であり、YはOHまたはC末端保護基である)を有するジペプチドを製造する方法において、式



(式中、Aは先に定義したとおりであり、R<sup>1</sup>は水素、アルキル、アリールもしくはアラールキルであつて不活性置換基によつて置換されていてもよく、またアミノ酸のD-デス-アミノフラグメントであり、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は同様もしくは異様であつて、それぞれ水素、アルキル、アリールまたはアラールキルであつて不活性置換基

特許出願番号  
PCT/DK88/00022

## 1. 特許出願の表示 PCT/DK88/00022

2. 発明の名称  
ジペプチドの酵素的製造方法

## 3. 特許出願人

住所(居所) デンマーク国 ディーケイー 2200 コペンハーゲン エヌ、  
ダケンスベユ 16

氏名(名称) カールスバーグ バイオテクノロジー リミテッド アクチーセルスカブ

## 4. 代理人

住所  
氏名 (6669) 渡 村 皓

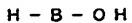
## 5. 補正書の提出年月日 1988年7月18日

## 6. 添付書類の目録 補正書の翻訳文 1通



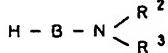
で置換されていてもよい)を有するアミノ酸残基等体である基質成分を、A-Bの場合は in situで形成されてもよい、

## 構式



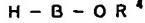
(式中、Bは先に定義したとおりのアミノカルボン酸である)を有するアミノ酸、

## 構式



(式中、Bは先に定義したとおりのアミノカルボン酸であり、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は上述の意味を有するが、R<sup>2</sup>が水素の場合にはR<sup>3</sup>はヒドロキシまたはアミノである)を有するアミノ酸アミド、

## 構式



(式中、Bは先に定義したとおりのアミノカルボン酸であり、R<sup>4</sup>はアルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するアミノ酸エステル、および

## 構式



(式中、xは1~6であり、zは2~12である)を有する直鎖状または分枝状アミノホスホン酸またはアミノスルホン酸

特表平1-502158 (15)

アチダーゼである請求の範囲第1項による製造方法。

(5) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、天然型の化学修飾された酵素または生合成異体である酵素の範囲第1項から第4項までによる製造方法。

(6) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、固定化されている前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(7) 有機溶媒 0~70% を含有する水性反応溶媒または反応分散液を使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(8) 有田田媒はアルコール類、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメトキシエタン、エチレングリコールまたは酢酸ユーテルから選ばれる請求の範囲第7項による製造方法。

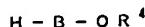
(9) 基質成分として、不活性炭換益で置換されてもよいベンジルエステルまたは直鎖状もしくは分枝状のC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルエステルから選ばれるD-またはL-アミノ酸エ斯特ルを使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(10) (補正) 求核成分として、式

$H - B - O H$  または  $H - B - N H R^3$

(式中、R<sup>3</sup>は水素またはC<sub>1</sub>～C<sub>3</sub>アルキルであり、BはL-アミノ酸残基である)を有するアミノ酸またはアミノ酸アミドを使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(11) 求核成分として、式



(式中、Bはアミノカルボン酸残基であり、R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub>～C<sub>3</sub>アルキルである)を有するエステルを使用する請求の範囲第1項による製造方法。

(12) 捷られたジペアチドが 1 個または 2 個以上の C 末端保護基 Y を包含し、この 1 個または 2 個以上の基を酵素的に、好ましくは前の反応で使用したと同じカルボキシペアチダーゼ酵素により切断する前記試験の範囲のいずれかによる製造方法。

(13) 指られたジペチドが1個または2個以上の既製保護剤を含めし、この1個または2個以上の剤を野菜的に、好ましくはエステラーゼもしくはリバーゼまたはタンパク分解酵素によって切断する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

International Application No PCT/DK88/00022		
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification systems apply, indicate all)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classifications and IPC		
C 22 F 21/02, C 07 K 1/00		
B. FIELDS SEARCHED		
International Bibliographic Searcher *		
Classification System   Classification System		
IPC 4	C 12 P 21/02; C 07 K 1/00 - /14	
IPC 3	C 07 C 103/52; C 12 D 13/06 .../...	
Documentation Searched other than International Documentation in the Event that such Documentation are Included in the Panel Searcher *		
SE, ND, DK, FI classes as above		
D. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*		
Category   Content of Document, with indication, where appropriate, of the International Reference   Related to Claim No. *		
Y	EP, A1, 0 074 095 (TOYO SODA MANUFACTURING CO LTD) 16 March 1983 See page 17, lines 13-35	1-13
Y	EP, A1, 0 086 053 (UNIFIKA LTD) 19 August 1983 See the claims	1-12
Y	EP, A1, 0 099 585 (TOYO SODA MANUFACTURING CO LTD) 1 February 1984 See the claims	1-12
Y	EP, A1, 0 017 485 (DC FORENDE BRYGGERIER A/S) 15 October 1980 See page 3, lines 1-3, page 6-7 and the claims	1-12
A	US, A, 3 972 773 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER) 3 August 1976	1-12
* A detailed description of each document is available on request.		
* The document containing the earliest date of the one which is not claimed is not included in the panel search and the panel searcher is not bound by it.		
* The panel searcher has no obligation to search for or file international applications.		
* The panel searcher may draw attention to patent, electrical or similar or to other documents having a relationship to the subject matter of the application.		
* The panel searcher may draw attention to documents which are not patentable or which do not contain new technical information.		
* The panel searcher may draw attention to documents which are not patentable or which do not contain new technical information.		
* The panel searcher may draw attention to documents which are not patentable or which do not contain new technical information.		
* The panel searcher may draw attention to documents which are not patentable or which do not contain new technical information.		
* The panel searcher may draw attention to documents which are not patentable or which do not contain new technical information.		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Commencement of the International Search	Date of Filing of the International Search Report	
1988-08-15	1988-05-17	
International Bibliographic Searching Activity		
Swedish Patent Office <i>Jonne Söderström</i> <i>Yvonne Söderström</i>		

## 特表平1-502158(16)

International Application No. PCT/DK88/00022

International Application No. PCT/DK88/00022

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		
II	Fields searched (cont.) US CI 435:68-70; 192:4, 29, 30	
<p><input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE*</p> <p>The International Search Report has not been conducted in respect of certain claims under Article 17(2) set out below (indicated by claim numbers). Because they relate to subject matter not required to be searched by the Authority, namely:</p> <p><input type="checkbox"/> Claim numbers _____ because they relate to parts of the International application that do not comply with the provisions of Article 17(2).</p> <p><input type="checkbox"/> Claim numbers _____ because they relate to parts of the International application that do not comply with the provisions of Article 17(2) and Article 19(1).</p> <p><input type="checkbox"/> Claim numbers _____ because they relate to parts of the International application that do not comply with the provisions of Article 17(2) and Article 19(1).</p> <p><input type="checkbox"/> Claim numbers _____ because they relate to parts of the International application that do not comply with the provisions of Article 17(2) and Article 19(1).</p> <p><input type="checkbox"/> Claim numbers _____ because they relate to parts of the International application that do not comply with the provisions of Article 17(2) and Article 19(1).</p> <p><input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING*</p> <p>The International Searching Authority found certain inventions in one International application as follows:</p> <p><input type="checkbox"/> All of requested additional search fees were directly paid by the applicant, this International search report covers all countries other than the International application.</p> <p><input type="checkbox"/> As only some of the requested additional search fees were directly paid by the applicant, this International search report covers only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:</p> <p><input type="checkbox"/> No requested additional search fees were directly paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims it is covered by claim numbers:</p> <p><input type="checkbox"/> All of additional claims, found to represent distinct subject matter, an additional fee, the International Searching Authority did not require payment of any additional fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were compensated by applicant's agent.</p> <p><input type="checkbox"/> No agent compensated the payment of additional search fees.</p>		

Form PCT/ISA/012 (Supplemental sheet) (02 January 1982)

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT - CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		
Category I	Character of Document, with reference, where appropriate, of the relevant passage	Comment in Case No.
A	US. A. 8 086 136 (ISOMA ET AL) 25 April 1978	1-12

Form PCT/ISA/012 (Supplemental sheet) (02 January 1982)

## 第1頁の続き

@発明者 アースムルーオルセン, スティ  
ツグデンマーク國 ディーケイ-2942 スコドスボルグ, エステー  
ティーブイ, スコドスボルグベユ 410